



FACULDADE DE DESPORTO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Efeito Protetor da Corrida Voluntária Regular na Toxicidade Hepática Induzida pela Administração Prolongada de Doxorrubicina em Ratos Wistar

Dissertação apresentada com vista à obtenção do grau de mestre em Atividade Física e Saúde, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto ao abrigo do Decreto de Lei n.º 74/2006 de 24 de março. A parte experimental desta dissertação foi realizada no Centro de Investigação de Atividade Física, Saúde e Lazer (CIAFEL)

Orientador Professor Doutor José Alberto Ramos Duarte

Márcio Fernando Martins da Cruz

Porto, 2017

Cruz, M. (2017). Efeito Protetor da Corrida Voluntária Regular na Toxicidade Hepática Induzida pela Administração Prolongada de Doxorrubicina em Ratos Wistar. Porto: M. Cruz. Dissertação apresentada a provas para obtenção do grau de Mestre em Atividade Física e Saúde, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Porto.

Palavras Chave: Quimioterapia, Fígado, Antraciclina, Exercício Físico, Dano Histológico, Colagénio

Agradecimentos

Gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho:

Em primeiro gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor José Alberto Duarte, sem o qual este trabalho não seria possível. Por se ter disponibilizado em me ajudar quando o procurei. Pela paciência que teve comigo em me ensinar e explicar como fazer melhor, sempre com a preocupação que o aluno entenda as ideias e o conhecimento que transmite. Pelo excelente profissional que é, e por me ter possibilitado aprender mais, o meu muito obrigado.

À dona Celeste Maria Resende dos Santos, agradeço todo o apoio e paciência que teve comigo. Sem o seu conhecimento técnico e ajuda, não teria conseguido chegar ao final deste processo. Pelos momentos divertidos que passamos, mas sempre com imenso profissionalismo, o meu muito obrigado.

Aos meus colegas, em particular à Daniela e ao Daniel, que nas suas horas de folga sempre se disponibilizaram para me ajudar naquilo que precisei. À Ju, à Ana, ao Nilton, ao Tony, à Cris, e a todos os que passaram no CIAFEL nestes últimos dois anos, que sempre me apoiaram quando lhes pedi ajuda.

À minha família:

À minha esposa e filhas, pela paciência que tiveram comigo ao longo destes dois últimos anos. Pelos momentos que estive ausente e não as acompanhei da forma que devia e queria, com o objetivo de terminar mais uma etapa da minha vida, a elas o meu obrigado.

Aos meus pais, por me incentivarem a não desistir e por toda a força que me deram para que conseguisse superar mais esta etapa, ajudando-me sempre que precisei.

A todos muito obrigado.

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. Tratamentos Quimioterápicos	24
2.2. Toxicidade da doxorrubicina	27
2.2.1. Influência do exercício físico	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Caracterização da amostra e desenho experimental	33
3.2. Sacrifício dos animais, recolha e processamento dos tecidos	34
3.3. Procedimentos de análise morfológica	35
3.4. Análise Estatística	36
4. RESULTADOS	39
4.1. Caracterização da amostra e corrida voluntária	39
4.2. Quantificação do dano hepático	40
4.3. Conteúdo de colagénio	45
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55

Índice de Figuras

Figura 1 - Desenho experimental.	33
Figura 2 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril (SSSG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal, apesar da ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino. Não há outros sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.	40
Figura 3 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorrubicina (DOXG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual aparentemente normal mas com uma acentuada esteatose microvesicular generalizada e uma grande dilatação dos sinusoides hepáticos (setas pretas) em alguns ácinos. Nas fotografias é também notório o edema do espaço peri-portal com infiltração desta região por células inflamatórias (setas amarelas).	41
Figura 4 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril sedentário (SSSsedG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal apesar da ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino e de uma aparente dilatação sinusoidal (setas pretas). Não há outros sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.	42
Figura 5 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorrubicina sedentário (DOXsedG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Para além da acentuada dilatação sinusoidal dispersa (setas pretas), é observável uma área extensa de necrose celular confluyente de hepatócitos com infiltração hemorrágica, assim como uma zona necrótica peri-portal com infiltração leucocitária (setas amarelas).....	43
Figura 6 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril exercitado (SSSexeG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal com uma ligeira dilatação dos sinusoides hepáticos. Não há sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.	44
Figura 7 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorrubicina exercitado (DOXexeG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal mas com uma ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino e dilatação dos sinusoides hepáticos (setas pretas). Na fotografia da direita, é observável uma região peri-portal, sem edema, mas com infiltração leucocitária (setas amarelas).....	44
Figura 8 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais dos grupos solução salina estéril (SSSG), solução salina estéril sedentário (SSSsedG), solução salina estéril exercitado	

(SSSexeG), doxorrubicina (DoxG), doxorrubicina sedentário (DoxSedG) e doxorrubicina exercitado (DoxExeG), coradas com Sirius red, representativas da estrutura hepática dos animais destes grupos..... 46

Figura 9 - Valores (média \pm desvio padrão) da percentagem de colagénio na área hepática em, grupo solução salina estéril (SSSG), grupo solução salina estéril sedentário (SSSsedG), grupo solução salina estéril ativo (SSSexeG), grupo doxorrubicina (DOXG), grupo doxorrubicina sedentário (DOXsedG) e grupo doxorrubicina exercitado (DOXexeG). 47

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Valores (média \pm desvio padrão) do peso corporal e do peso absoluto e relativo do fígado de todos os grupos, assim como da distância total realizada pelos grupos ativos..... 39

Tabela 2 - Valores de mediana e amplitude interquartil dos parâmetros utilizados para quantificação do dano tecidual..... 45

Resumo

O cancro tornou-se nas últimas décadas uma doença progressivamente mais prevalente, adquirindo hoje, nos países ocidentais, um caráter epidémico. A doxorubicina (DOX), uma antraciclina usada no tratamento de diversos cancros, encontra-se associada ao aparecimento de vários efeitos colaterais indesejáveis, resultantes da sua toxicidade nos mais diversos órgãos e tecidos em doentes oncológicos. O metabolismo de alguns fármacos, em particular da DOX, pode a curto e a longo prazo tornar-se prejudicial para o tecido hepático, resultando na sua disfunção. No entanto, a atividade física (AF) regular poderá ser utilizada como um recurso terapêutico para a diminuição desses efeitos nefastos. Vários estudos têm demonstrado os benefícios da prática regular de exercício físico (EF) na diminuição da toxicidade hepática induzida pela DOX em ratos saudáveis, nomeadamente nos parâmetros referidos anteriormente. O objetivo deste trabalho foi assim caracterizar, em ratos Wistar, a toxicidade hepática resultante da prolongada administração de DOX mimetizando um protocolo de quimioterapia, e verificar se a corrida voluntária regular realizada à *posteriori*, a poderá reverter. Quarenta ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em 2 *clusters*: 1) tratados com uma injeção/semana intraperitoneal (ip) de 3 mg/Kg de DOX, durante 7 semanas (n=17) e 2) tratados com uma injeção/semana ip de solução salina estéril (SSS), durante 7 semanas (n=17). Duas semanas após a última injeção, 5 animais de cada *cluster* foram sacrificados (SSSG, n=5; DOXG, n=5), tendo os restantes sido divididos em 2 subgrupos: 1) sedentários (DOXsedG, n=6; SSSsedG, n=6), alojados em gaiolas sem roda para corrida voluntária, e 2) ativos (DOXexeG, n=6; SSSexeG, n=6), alojados em gaiolas com roda para corrida voluntária. Ao final de 8 semanas, os animais foram sacrificados e recolhidas amostras hepáticas para, histologicamente, se avaliar o grau de dano hepático, assim como o seu conteúdo em colagénio. Os resultados encontrados mostraram que os animais DOXG, apresentaram esteatose generalizada acentuada e uma maior inflamação comparativamente aos do grupo SSSG. A longo prazo, no grupo DOXsedG observou-se uma acentuada dilatação sinusoidal, numerosas

zonas necróticas e uma abundante infiltração de células sanguíneas, com o grupo SSSsedG evidenciando uma estrutura normal. Nos animais DOXexeG, as alterações histológicas foram significativamente inferiores ao grupo DOXsedG. Os resultados permitem concluir que a administração prolongada de DOX, mimetizando um tratamento quimioterápico, tem efeitos tóxicos hepáticos a curto (DOXG vs SSSG) e a longo prazo (DOXsedG vs SSSsedG), e que a corrida voluntária regular, efetuada após a administração da DOX, atenua os efeitos tóxicos hepáticos a longo prazo.

Palavras-chave: Quimioterapia, Fígado, Antraciclina, Exercício Físico, Dano Histológico, Colagénio

Abstract

In last decades, cancer becomes more progressive, acquiring today, in the western countries, an epidemic character. Doxorubicin (DOX), an anthracycline used in several cancer treatments, is associated with the appearance of several undesirable side effects resulting from its toxicity in the most diverse organs and tissues in cancer survivors. The metabolism of some drugs, in particular DOX, in short and long-term become harmful to liver tissue, resulting in its dysfunction. However, regular physical activity (RAF) could be used as a therapeutic resource to reduce these harmful effects. Several studies have demonstrated the benefits of regular exercise (RE) in the decrease of DOX-induced liver toxicity in healthy rats, particularly in the parameters discussed above. The aim of this study was to characterize the hepatic toxicity resulting from the prolonged administration of DOX mimicking a chemotherapy protocol, and to verify if a regular voluntary exercise performed posteriori can reverse it in Wistar rats. Forty male Wistar rats were randomly divided into 2 clusters: 1) treated with an intraperitoneal (ip) injection of 3 mg / kg DOX for 7 weeks (n = 17) and 2) treated with an ip injection / week of sterile saline solution (SSS), for 7 weeks (n = 17). After two weeks of the last injection, 5 animals from each cluster were sacrificed (SSSG, n = 5, DOXG, n = 5), the remaining were divided into 2 subgroups: 1) sedentary (DOXsedG, n = 6; = 6), housed in cages without wheel for voluntary running, and 2) active (DOXexeG, n = 6; SSSexeG, n = 6) housed in cages with free wheel access for voluntary running. At the end of 8 weeks, animals were sacrificed and hepatic samples were taken to histologically assess, to measure the degree of hepatic damage as well as their collagen content. The results revealed that the DOXG animals showed a general marked steatosis and a higher inflammation compared to the SSSG group. At long-term, in DOXsedG group there was a pronounced sinusoidal dilatation, numerous necrotic zones and an abundant infiltration of blood cells, with the SSSsedG group evidencing a normal structure.

In DOXexeG animals, histological changes were significantly lower than the DOXsedG group. The results allow us to conclude that a prolonged DOX administration, mimicking a chemotactic treatment, has short (DOXG vs SSSG) and long-term (DOXsedG vs SSSsedG) toxic effects, and regular voluntary running, performed after administration of DOX, attenuates long-term toxic effects of the liver.

Key Words: Chemotherapy, Liver, Anthracyclines, Physical Exercise, Histological Damage, Collagen

Lista de Abreviaturas

AF: Atividade Física

CTEm: Cadeia Transportadora de Eletrões Mitocondrial

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DOX: Doxorrubicina

DOXexeG: Grupo Doxorrubicina Exercitado

DOXG: Grupo Doxorrubicina

DOXsedG: Grupo Doxorrubicina Sedentário

EF: Exercício Físico

ERO: Espécies Reativas de Oxigénio

HE: Hematoxilina e Eosina

IARC: International Agency for Research on Cancer

ip: intraperitoneal

O₂: Oxigénio

RNA: Ácido Ribonucleico

SO: Stress Oxidativo

SR: Sirius Red

SSS: Solução Salina Estéril

SSSexeG: Grupo Solução Salina Estéril Exercitado

SSSG: Grupo Solução Salina Estéril

SSSsedG: Grupo Solução Salina Estéril Sedentário

WHO: World Health Organization

β: Beta

1. INTRODUÇÃO

Vista sob o prisma da análise histórica, cada época tem a sua doença simbólica. Se no fim do século XIX, esse lugar cabia à tuberculose, a denominada peste branca acabou por dar lugar quase em simultâneo ao problema crescente do cancro, sobretudo quando a tecnologia médica foi capaz de começar a reduzir drasticamente a mortalidade por tuberculose pulmonar desde os meados do século XX (1). Com o afastamento do espectro mortal da tuberculose, foi no decurso do século XX que o cancro assumiu o seu estatuto de doença maldita, estigmatizante, discriminatória e desmoralizadora (1, 2). Vista como patologia “incurável”, “degenerativa”, “devastadora”, “invasiva” e “corrosiva”, os tratamentos curativos que lhe estão associados também partilham da mesma carga metafórica, sendo popularmente apelidados de “mutilantes”, “venenosos” e “agressivos” (1). Em certa medida, a história desta patologia permite compreender a génese do “medo do cancro”, e ainda o significado profundo dos esforços talhados no campo científico no sentido de o extinguir. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (3) defende que a evolução demográfica e a exposição a determinados fatores de risco determinarão um aumento da incidência de doenças oncológicas nos próximos anos. O cancro tornou-se nas últimas dezenas de anos uma doença progressivamente mais frequente, adquirindo hoje, nos países ocidentais, um carácter epidémico. Esse aumento de frequência traduz, por um lado, o aumento da incidência, isto é, o aumento do número de novos casos que ocorrem anualmente e, também uma deteção cada vez mais precoce com melhores meios de diagnóstico o que leva a uma melhoria dos resultados obtidos no tratamento dos doentes, permitindo um maior prolongamento de vida dos casos existentes (4). Além do elevado número de pessoas cujos cancros são tratados num estado precoce e são curadas, há cada vez mais doentes que sobrevivem com a doença controlada após o tratamento (4). A conjugação do aumento da incidência com a maior sobrevida dos doentes faz

com que o número de doentes com cancro na população se encontre também em franco crescimento. Embora não haja dados precisos sobre o que se passa em Portugal no seu todo, é possível prever uma situação muito semelhante à dos parceiros europeus, prevendo-se que um em cada três portugueses nascidos na última década terá um diagnóstico de cancro durante a sua vida (4). No entanto, também se estima que mais de metade dos doentes com cancro sobreviverá à doença. Isto é, em Portugal, como nos outros países ocidentais e em diversos países da Ásia e da América do Sul, consegue-se curar ou, pelo menos, controlar a doença em mais de 50% dos doentes (4).

Os atuais métodos terapêuticos para o tratamento das neoplasias malignas incluem as ressecções cirúrgicas, a radioterapia, a quimioterapia e a hormonoterapia (5). Embora muitos desses tratamentos sejam efetivos na remoção e/ou ataque às células malignas, sabe-se que algumas dessas intervenções também afetam células de órgãos e tecidos saudáveis, desencadeando uma série de efeitos nocivos que podem levar a debilitações agudas e crónicas em função da citotoxicidade (5, 6). Segundo Bonassa (7), a quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas, atuando a nível celular, interferindo no processo de crescimento e divisão, contudo sem especificidade, não destruindo seletiva ou exclusivamente as células tumorais. Por não possuírem especificidade, os agentes quimioterápicos não agredem seletiva ou exclusivamente as células tumorais. Essas drogas agredem também células normais que possuem características comuns às células tumorais, ou seja, rápida proliferação, caracterizada por alta atividade mitótica e ciclo celular curto. Em consequência desta toxicidade às células não neoplásicas surgem os efeitos colaterais indesejáveis dos quimioterápicos (7,8). Além dos efeitos colaterais apresentados pelo paciente, tais como o exagero da anorexia, da astenia e emagrecimento, a administração de quimioterápicos pode apresentar toxicidade específica, como a cistite hemorrágica, associada ao uso de ciclofosfamida, o íleo paralítico, associado ao uso dos alcalóides da vinca, ou a lesão do miocárdio, associada ao uso da doxorrubicina (DOX) (7, 8, 9). A DOX, tem sido um dos agentes antineoplásicos mais prescrito no mundo devido ao

seu extenso espectro de ação (10, 11). Deste modo, a sua aplicação e eficácia clínica estendem-se ao tratamento de várias neoplasias, como por exemplo, as de células linfoblásticas e mioblásticas, leucemias, neuroblastomas, linfomas, carcinomas da mama, da bexiga e da tireoide (10, 14). Em contraste, os câncros em jovens são quase inteiramente leucemias, linfomas, sarcomas e cancro do sistema nervoso central, principalmente neoplasias que surgem de tecido não ectodérmico, como medula óssea, gânglios linfáticos, osso e músculo (119, 120). As taxas de sobrevivência entre crianças com cancro excedem as observadas entre os adultos (78% vs. 62%) (119). Um maior sucesso no tratamento do cancro infantil pode, em parte, ser explicado por diferenças biológicas entre câncros adultos e infantis (120). No entanto, a vasta utilização desta antraciclina em jovens nos últimos 50 anos, encontra-se fortemente associada a um efeito secundário nefasto, em indivíduos curados do cancro, a cardiotoxicidade, que afeta a longo prazo a morbilidade e mortalidade destes indivíduos (12, 13). Este fármaco pode exercer efeitos tóxicos agudos e crónicos no sistema cardiovascular, chegando a causar 50% de mortalidade para as doses cumulativas mais elevadas (15). Uma das hipóteses mais estudadas sugere que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é consequência de lesão mitocondrial e aumento do stress oxidativo (SO), em parte, devido à elevada concentração destes organelos no coração, cerca de 10 vezes superior à concentração noutros tecidos, como por exemplo no fígado, rim e baço (16,17). A grande incidência de cardiotoxicidade, explica-se pelo facto do coração ser o tecido corporal com maior densidade de volume mitocondrial (aproximadamente 35% do volume de células) e pelo facto das mitocôndrias serem uma importante fonte para a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO), pelo reduzido *turnover* dos cardiomiócitos assim como pelo nível relativamente baixo de enzimas antioxidantes comparativamente a outros tecidos (18). Além da toxicidade cardíaca descrita na literatura, a DOX induz igualmente toxicidade noutros tecidos, entre eles, o hepático (26, 27). O fígado desempenha funções vitais, essenciais à homeostasia corporal, entre elas, a inativação e secreção de toxinas (28, 29). Por isso é considerado, o alvo mais comum da toxicidade de alguns fármacos (28, 30). Segundo (15), desde 1970

que os efeitos de toxicidade cardíaca da DOX são reconhecidos como uma grave complicação da terapêutica com antraciclinas. Contudo, apenas em 1991 foram identificados efeitos cardiotóxicos tardios em sobreviventes de leucemia infantil, o que veio revelar o facto de este fármaco exercer efeitos tóxicos tanto a curto, como a longo prazo (15). Numa tentativa de neutralizar, atenuar ou mesmo reverter os efeitos colaterais causados pela DOX, tem sido realizado um grande esforço no sentido de desenvolver intervenções que minimizem os seus efeitos cardiotóxicos. Entre as várias estratégias testadas, o exercício físico (EF) tem sido alvo de atenção, com várias evidências a sugerir que este é capaz de conferir proteção cardíaca contra os efeitos agudos (19, 20, 21) e crónicos da DOX (21). Atualmente é cada vez mais suportada por evidências científicas a ideia de que a prática de EF regular possibilita a aquisição de inúmeros benefícios para a saúde, quer física, quer mental do praticante. A World Health Organization (WHO), sugere que, a atividade física (AF) e/ou o EF, devam ser entendidos pelos indivíduos como meio de terapia complementar do cancro. No que se refere a pacientes com cancro, uma rotina de EF adaptado deve ser promovida desde o diagnóstico da doença, a fim de diminuir a fadiga e atenuar os efeitos secundário dos tratamentos. Segundo (22,23) a AF, quando realizada de maneira regular, tem demonstrado ser um opositor aos efeitos nefastos, indesejáveis do tratamento, resultando numa melhoria da aptidão cardiovascular, respiratória e muscular esquelética. Estas melhorias ocorrem não só com intervenções efetuadas após o tratamento convencional, mas também durante o mesmo. De facto, o exercício tem-se assumido como uma importante medida não-farmacológica de enorme potencial, capaz de aumentar a tolerância à cardiotoxicidade da DOX, provavelmente devido a uma melhor funcionalidade mitocondrial cardíaca (24,19), com diminuição da lesão oxidativa e da produção de ERO (25). Muitos estudos centram-se no desafio metabólico que o EF representa para o músculo e para o coração, no entanto também o fígado parece assumir funções importantes no controlo do metabolismo orgânico (31, 32). Os benefícios que o exercício agudo pode exercer sobre o tecido hepático incluem o aumento da biogénese mitocondrial, devido à grande mobilidade de nutrientes e a

aceleração geral da função metabólica (31). Segundo (31) os resultados obtidos após 60 minutos de exercício agudo parecem constituir um estímulo eficiente com efeitos pronunciados na regulação da expressão genética do fígado (32). Não são conhecidos estudos que mostrem os efeitos protetores do exercício no tecido hepático após tratamento com DOX, daí a importância de caracterizar as alterações histológicas hepáticas induzidas por esta antraciclina. Vários estudos demonstraram que a combinação do processo inflamatório, SO, formação de radicais livres e de peroxidação lipídica, está frequentemente associada a danos no fígado, induzida por agentes tóxicos como a DOX (33, 34). Desta forma, se o exercício se tem demonstrado favorável na proteção do coração, ele também poderá ser favorável para o fígado. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi mimetizando um protocolo de quimioterapia, testar se a prática de EF realizado *a posteriori*, pode reverter os efeitos da toxicidade hepática resultante da prolongada administração de DOX.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Apesar de ser designado de uma maneira muito genérica, o cancro não é uma doença única nem, muito menos, possui uma única causa. Conforme refere (1), trata-se de um grupo de doenças distintas, abarcando mais de 200 tipos diferentes de tumores, também designados por neoplasias, cada um deles com características particulares, causas, manifestações, evolução, prognósticos e tratamentos específicos, mas que pelas suas características fisiopatológicas se englobam sobre a mesma designação genérica. Segundo (35), as neoplasias são qualquer massa de células que surge por divisão inapropriada de uma célula mãe original (multiplicação clonal), na qual a expressão dos genes que regulam a divisão celular está alterada. Segundo os mesmos autores, do ponto de vista de prognóstico, existem dois tipos de neoplasias: as benignas e as malignas. As neoplasias malignas, ao contrário das benignas, possuem duas características potenciais que podem ou não estar expressas na altura em que a doença é diagnosticada: podem infiltrar localmente os tecidos circunvizinhos, incluindo órgãos que estão próximos e podem metastizar à distância, isto é, disseminar-se por outros órgãos diferentes daquele de onde se originam (por exemplo: fígado, pulmão, osso, etc); As neoplasias malignas são muito diversas, havendo causas, formas de evolução e tratamentos diferentes para cada tipo. Há, porém, uma característica comum a todas elas: a divisão e o crescimento descontrolado das células. No entanto, nem todas as neoplasias têm carácter invasivo. Algumas são consideradas malignas apesar de serem em tudo semelhantes às benignas, porque produzem graves danos pela produção de hormonas, ou comprimem órgãos devido ao seu crescimento (36). As neoplasias benignas, em geral, não se transformam em malignas, apesar de existirem numerosas exceções. Em casos raros, as neoplasias de comportamento benigno podem levar à morte, se o seu crescimento local comprimir mecanicamente uma artéria, veia ou nervo importante (35). No que diz respeito à classificação

histológica, as neoplasias qualificam-se de acordo com o tipo de células avaliado pela anatomia patológica (36). Segundo (36), inicialmente as neoplasias produzem sintomas geralmente inespecíficos ou até podem ser assintomáticas. Embora nem sempre seja fácil estabelecer um diagnóstico precoce, para a esmagadora maioria dos tipos de neoplasia existem alguns sinais e sintomas de alarme. Para o mesmo autor, os sinais e sintomas mais frequentes são o aparecimento de um nódulo ou massa anormal, a dor persistente no tempo, um sinal ou verruga que se modifica, a perda anormal de sangue ou outros líquidos, a tosse ou rouquidão persistente, a alteração nos hábitos digestivos, urinários ou intestinais e perda de peso não justificada. Numa fase mais avançada, outros dos sinais e sintomas característicos são a caquexia, que se caracteriza pela perda acentuada de peso e perda da massa muscular, a anemia, a astenia, a falta de apetite e a temperatura sub-febril. Em 10% dos doentes com neoplasia poderá também haver uma síndrome paraneoplásica, com síndromes auto-imunes ou com produção tumoral de hormonas, havendo sinais e sintomas relativos ao seu excesso (Ex: Síndrome de Cushing) (35). A síndrome paraneoplásica refere-se a um conjunto de sinais e sintomas que antecedem ou que ocorrem simultaneamente com a presença de uma neoplasia e não estão relacionados diretamente com os efeitos metastáticos do tumor (37). Estes fenómenos incluem uma série de condições músculo-esqueléticas, cutâneas, endocrinológicas, neurológicas, metabólicas ou hematológicas (37).

2.1. Tratamentos Quimioterápicos

O tratamento do cancro tem evoluído bastante ao longo do tempo, com melhorias muito significativas para o doente em termos de eficácia e de qualidade de vida (3). Na atualidade, os estudos relacionados à quimioterapia têm-se dirigido, antes que à descoberta de novas drogas, ao desenvolvimento da terapêutica como planeamento de esquemas mais eficientes para a administração concomitante de drogas, à aquisição de conhecimentos a respeito do mecanismo de ação de muitas drogas antitumorais, à maior

compreensão dos mecanismos de resistência às drogas antineoplásicas, ao maior uso da terapia adjuvante e neoadjuvante e à aquisição de conhecimentos sobre a biologia tumoral (7,38). A terapia antineoplásica ou antitumoral consiste no emprego de agentes quimioterápicos no tratamento do cancro (3). No que diz respeito à sua estrutura química e função, os quimioterápicos classificam-se em agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antitumorais, nitrosuréis, alcalóides da vinca e miscelânea (incluindo medicamentos hormonais) (7, 39). Os agentes alquilantes são quimioterápicos capazes de causar alterações nas cadeias do ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, impedindo sua replicação em qualquer fase do ciclo, isto é, células em repouso ou em processo de divisão ativa (7, 39). Os agentes antimetabólitos são aqueles que estruturalmente se assemelham aos metabólitos naturais, essenciais ao funcionamento celular, incorporando-se à célula e transmitindo mensagens errôneas, bloqueando assim a produção de enzimas necessárias à síntese de substâncias fundamentais ou ligando-se às cadeias do DNA e ácido ribonucleico (RNA), especificamente na fase “S” da divisão celular, quando se dá a síntese do DNA (7, 39). Antibióticos antitumorais são agentes resultantes da fermentação de fungos que possuem propriedades citotóxicas, interferindo na síntese de ácidos nucleicos através de ligação, impedindo a duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA (7, 39). Nitrosuréis são agentes com ação similar à dos agentes alquilantes, sendo, contudo, lipossolúveis e passando assim pela barreira hematoquímica. Algumas atuam em fases específicas do ciclo celular, outras não, sendo capazes de agredir células tanto em fase G0 como em processo de divisão ativa (7, 39). Alcalóides da vinca são inibidores mitóticos que atuam especificamente sobre células em fase de mitose, impedindo a formação dos microtúbulos, estruturas responsáveis pela polarização dos cromossomos, indispensável no processo de divisão celular (7, 39). Um grupo de agentes antineoplásicos com mecanismos de ação variados, geralmente desconhecidos, diferentes dos descritos anteriormente, com características e toxicidades diversas entre si, compreende o grupo conhecido como miscelânea (7, 39). Este grupo inclui agentes hormonais, que por vezes, são utilizados na terapia do cancro com o objetivo de deter o crescimento

tumoral. Uma vez que, para crescer e funcionar, muitos tumores, a exemplo de vários tecidos, dependem dos níveis hormonais, principalmente aqueles tumores derivados de mama, próstata, útero e tireoide, a manipulação de hormonas tem a finalidade de inibir o crescimento desses tumores. Contudo, esta finalidade é mais paliativa do que curativa (7, 39).

De acordo com o objetivo do tratamento quimioterápico, existem diferentes tipos e formas de quimioterapia. A quimioterapia é dita adjuvante quando indicada após a retirada cirúrgica completa do tumor ou após radioterapia curativa e na ausência de metástases detetáveis (7, 8, 9, 40). A neoadjuvante, prévia ou citorredutora é a quimioterapia indicada antes da cirurgia ou radioterapia, com a finalidade de reduzir o risco de metástases ou promover a redução de tumores possíveis de tratamento local (7, 8, 9, 40). Quanto às formas de administração, estas podem ser sistêmica, quando aplicada endovenosamente, ou regional, quando instalada dentro de fluidos orgânicos específicos (medula espinhal, peritoneu, pleura), com a finalidade de atingir espaços que a quimioterapia sistêmica não consegue atingir (chamados santuários), ou por via de cateterização arterial (8, 40). No que diz respeito à resposta tumoral observada quando se emprega quimioterapia no combate ao cancro, (7) comenta que as respostas tumorais podem ser a “remissão completa”, quando o tumor e todos os sinais e sintomas da doença desaparecem durante pelo menos quatro semanas e o status de funcionamento do organismo volta ao normal. A “remissão parcial” ocorre redução de 50% ou mais do volume tumoral, e o status funcional do paciente melhora. A melhora ocorre quando há “redução de 25 a 50% do volume tumoral e alguma melhora funcional, mesmo que subjetiva”. É designada de “sem resposta” quando o tumor não mostra evidências de resposta e não ocorre melhora funcional. Quando aparece um novo tumor, nova metástase ou ocorre recidiva local, diz-se que há “progressão” do tumor (7).

No que diz respeito à toxicidade apresentada pelos quimioterápicos, pelo facto de não possuírem especificidade de ação, estes não agredem seletiva ou exclusivamente as células tumorais (4, 10). Estas drogas agredem também células normais que possuem características comuns às células tumorais, ou

seja, rápida proliferação, caracterizada por alta atividade mitótica e ciclo celular curto (4, 10). A toxicidade inespecífica pode apresentar-se dentro de poucas horas ou, em meses, ou anos após a administração de quimioterápicos, podendo, assim, ser classificada em toxicidade imediata, precoce, retardada e tardia. A toxicidade dos quimioterápicos é com frequência considerada, o fator limitante para dosagem e fracionamento das drogas, uma vez que seu agravo pode significar prejuízos irreversíveis e mesmo letais para o paciente (4, 6, 10). Os principais efeitos colaterais da quimioterapia são a toxicidade hematológica, gastrointestinal, a cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, a disfunção reprodutiva, toxicidade vesical e renal, alterações metabólicas, toxicidade dermatológica, reações alérgicas e anafilaxia (4).

2.2. Toxicidade da doxorubicina

A DOX, comercialmente denominada por adriamicina, é um antibiótico que pertence à classe das antraciclinas, usado há mais de 40 anos no tratamento de várias doenças cancerígenas (26, 41, 42, 45). Desde a sua descoberta, tem sido um dos agentes antineoplásicos mais prescrito no mundo devido ao seu extenso espectro de ação (10, 11). Deste modo, a sua aplicação e eficácia clínica estendem-se ao tratamento de várias neoplasias, como por exemplo as, leucemias linfoblásticas e mieloblásticas, os neuroblastomas, linfomas e carcinomas da mama, da bexiga e da tiroide (10, 14). O seu efeito anti tumoral está relacionado com a capacidade de se intercalar nas duplas hélices de ADN nuclear e mitocondrial ou de se ligar covalentemente a proteínas envolvidas na replicação e transcrição de ADN, como a topoisomerase II, desenvolvendo quebras irreparáveis no ADN, propiciando a morte celular e diminuindo a proliferação celular através da inibição da síntese proteica (43, 44). Contudo, o seu uso terapêutico é extremamente condicionado pelas alterações orgânicas nocivas que induz, nomeadamente ao nível cardíaco (43, 46, 47). De facto, o seu uso continuado exerce um efeito tóxico que é dependente da dose, irreversível e culmina sobretudo no desenvolvimento a longo prazo de insuficiência cardíaca e outras cardiomiopatias (46, 48, 49). Evidências

científicas comprovam que pacientes tratados com DOX apresentam maior risco por morte cardiovascular do que o risco de recorrência do tumor (50), 15 vezes mais propensão a sofrer insuficiência cardíaca (51), 10 vezes mais probabilidade de desenvolver doença coronária (52) e 7 vezes maior taxa de mortalidade cardíaca após o tratamento (50). O grau de cardiotoxicidade depende de fatores relacionados ao tipo de tratamento (tipo de fármaco, dose cumulativa e esquema de administração, combinação de drogas potencialmente cardiotóxicas ou associação com radioterapia) ou fatores relacionados ao paciente (idade, presença de fatores de risco cardiovascular ou preexistência de alguma doença cardíaca e irradiação anterior no mediastino) (44, 53, 54). Desta forma, existe um conjunto de efeitos colaterais indesejáveis induzidas pela administração desta tetraciclina e que podem ser classificados em agudos e crónicos (44, 55, 56, 57). A cardiotoxicidade aguda normalmente surge em minutos/horas após a sua administração (46, 58, 59), enquanto a subaguda é evidenciada somente alguns dias ou semanas após a administração. A hipotensão, taquicardia, arritmias, vasodilatação e alterações electro-cardiográficas são sinais dos efeitos agudos, desenvolvendo-se durante ou logo após a administração da DOX. Contudo são considerados reversíveis e clinicamente controláveis (42, 55, 57). Por sua vez, a cardiotoxicidade crónica causada pela DOX ocorre mais tardiamente, aproximadamente 1-20 anos após o fim do tratamento (60). Pode ser dividida em dois grupos de acordo com o aparecimento dos sintomas: inicial, quando os indícios se manifestam no primeiro ano após o fim do tratamento, e final, quando se manifestam 1 ano após a terapia (61). À semelhança dos efeitos agudos, os crónicos incluem hipotensão, taquicardia e, ainda, uma dilatação cardíaca e disfunção do ventrículo esquerdo, que podem levar a uma insuficiência cardíaca congestiva (58, 64). Uma das hipóteses mais estudadas sugere que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é consequência de lesão mitocondrial e aumento do SO, em parte, devido à sua elevada acumulação no coração, no qual a concentração é 10 vezes superior à concentração noutros tecidos, como por exemplo no fígado, rim e baço (17, 62). Tal deve-se ao facto do coração ser o tecido corporal com maior quantidade de mitocôndrias (aproximadamente 35% do

volume de células) (26, 63), as mitocôndrias serem consideradas uma evidente fonte para a produção de ERO (65), pelo reduzido turnover dos cardiomiócitos e pelo nível relativamente baixo de enzimas antioxidantes nestas células relativamente a outros tecidos (18). O SO é causado por um desequilíbrio entre a produção excessiva de ERO e de nitrogénio e diminuição da capacidade antioxidante e de reparação da célula, induzindo dano em macromoléculas como o ADN, proteínas e lípidos (66).

Tem sido sugerido que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é um processo multi-fatorial que pode culminar na morte das células cardíacas (44). Estudos realizados em animais mostram que a administração aguda da DOX induz alterações ultra-estruturais nos cardiomiócitos como edema intersticial, vacuolização perinuclear, desorganização e degeneração do miocárdio (67). Também (68), em ensaios experimentais, concluíram que baixas concentrações de DOX (0.5-1uM) causaram alterações nas proteínas estruturais dos cardiomiócitos, incluindo a lâmina nuclear e a miosina cardíaca. Em oposição, concentrações elevadas (5-50uM) promovem alterações celulares profundas, como intumescimento nuclear associado a uma rutura da membrana nuclear e vacuolização do citoplasma. Deste modo, a cardiotoxicidade está relacionada com alterações morfológicas e funcionais das mitocôndrias, como o intumescimento, vacúolos intra-mitocondriais, figuras de mielina e rompimento da membrana (41). Contudo, importa ressaltar, que apesar de todos os efeitos nefastos, a DOX é uma das terapias mais eficazes no tratamento de neoplasias. Através de novas abordagens terapêuticas e novos fármacos, muitos pacientes puderam a partir de então gozar de uma maior expectativa de vida.

O fígado tem um papel preponderante na metabolização e eliminação de fármacos (30, 69, 70, 71), a DOX é metabolizada no principal metabolito, o doxorubicinol e vários metabolitos citotóxicos de aglicona (75, 76). Pode-se também considerar o fígado como um alvo importante de toda toxicidade (29, 30, 72, 73, 74,). O seu envolvimento na toxicidade induzida por fármacos deve-se em grande parte à sua localização anatômica e às suas funções fisiológicas e bioquímicas (28, 70), intermediadas por enzimas altamente especializadas na

desintoxicação e vias metabólicas que transformam os xenobioticos em substâncias inofensivas para o organismo (30, 77). O metabolismo de alguns fármacos, em particular da DOX, pode tornar-se prejudicial para o tecido hepático resultando na sua disfunção (28). Cerca de 50% da DOX é removida do organismo por via metabólica (78) e de facto a sua redução em doxorrubicinol acontece no fígado (77, 79). Após a sua administração, cerca de 40% dos pacientes sofreram danos no tecido hepático (80), desta forma, alguns autores classificaram a hepatotoxicidade segundo a dependência da dose do fármaco, em intrínseca e idiossincrática. Desta forma, a hepatotoxicidade intrínseca é considerada como dependente de uma dose e os seus efeitos são previsíveis acima de um limite estabelecido, ao passo que a idiossincrática ocorre sem uma dependência da quantidade, sendo os seus efeitos imprevisíveis e associados às características individuais (29, 81). Do ponto de vista fisiológico, a mitocôndria é, de facto, responsável por produzir a maior quantidade de energia celular através da oxidação de vários substratos no seu sistema de fosforilação oxidativa (82). Desta feita, uma disfunção acentuada neste sistema pode prejudicar o metabolismo celular e a funcionalidade do hepatócito (83). Muitos autores sugerem que os efeitos nocivos, após a administração deste fármaco, podem comprometer a atividade mitocondrial através de uma inibição da síntese proteica, alteração da homeostasia do cálcio, aumento do SO e, conseqüente, peroxidação lipídica (28, 30). A maioria dos autores referem ainda que o aumento da formação de radicais livres induzida pela DOX assume-se como um dos principais mecanismos pelo qual este fármaco induz toxicidade no tecido hepático (27, 84, 87, 88) tal como no tecido cardíaco (10, 85, 86). Em estudos com animais administrados com DOX, foi possível verificar que o tecido hepático apresentava sinais de edema, com uma degeneração intracelular acentuada. Quase todos os hepatócitos apresentavam inúmeros vacúolos intracitoplasmáticos visíveis, e núcleos hipercromáticos dilatados (93, 94). Em consequência do aumento induzido de SO, a DOX pode comprometer a β -oxidação dos ácidos gordos, sendo considerado por alguns autores o mecanismo direto pelo qual as antraciclinas atuam induzindo toxicidade

hepática (82, 89, 92). Como consequência da inibição β -oxidação, os triglicerídeos hepáticos acumulam-se sob a forma de vesículas lipídicas, resultando numa esteatose microvesicular que pode culminar numa falência hepática a longo prazo (82, 91). A atividade da DOX parece estar associada a esta inibição e, por isso, com o decorrer do tempo, motivada pela morte dos hepatócitos e do tecido conjuntivo resultar uma esteatose macrovesicular (90). Assim sendo, uma redução na β -oxidação por comprometimento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, provavelmente a longo prazo, induzirá um quadro de esteatose hepática não alcoólica (34, 82, 89, 90).

Para além do sistema antioxidante enzimático que participa de forma decisiva contra o SO, têm sido sugeridas outras estratégias úteis no combate à toxicidade hepática associada à DOX, como a otimização da dose (79), o uso de análogos da DOX, suplementos antioxidantes e o EF (42, 43).

2.2.1. Influência do exercício físico

Devido à importância que a DOX representa no tratamento oncológico, vários esforços têm sido realizados no sentido de atenuar os seus efeitos adversos sem interferir com as suas propriedades anti tumorais. São cada vez mais os estudos que suportam a ideia de que prática regular de exercício possibilita a aquisição de inúmeros benefícios para a saúde física e mental do praticante (95, 100). É Indubitável que a AF exerce um papel importante na prevenção de algumas doenças (96, 99), nomeadamente em algumas doenças cardiovasculares, respiratórias, neurodegenerativas, miopatias e doenças do foro metabólico como a obesidade e a diabetes mellitus, entre outras (25, 98). O estudo do seu contributo, tem sido realizado nas mais diversas áreas que se ligam à globalidade do ser humano, incluindo estudos realizados na área das neoplasias malignas, quer como fator de prevenção quer como modalidade de tratamento (97). Ser fisicamente ativo parece reduzir o risco de certas neoplasias, sendo a AF moderada ou vigorosa aquelas que oferecem a maior proteção (101). Tendo em conta as alterações nocivas induzidas pela DOX

existe uma constante necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas eficazes a fim de encontrar um equilíbrio entre os danos gerados pelo fármaco e os benefícios da terapia oncológica com DOX. O EF tem-se assumido como uma importante medida não-farmacológica de enorme potencial, capaz de aumentar a tolerância à cardiotoxicidade da DOX. Sabe-se que o EF agudo (102, 104) e com destaque para o realizado com carácter crónico e prolongado (19, 24, 102, 103, 105) fornece proteção paralela ou atenua alguns dos efeitos tóxicos da DOX no coração (19, 20, 21, 47, 106, 107). Este efeito protetor é observado tanto com doses agudas elevadas (19, 20, 24, 102, 106, 108, 109) bem como com o tratamento crónico (20, 103, 105, 106), com doses menos agressivas. Muitos estudos centram-se no desafio metabólico que o EF representa para o músculo e para o coração, no entanto também o fígado parece assumir funções importantes no controlo metabólico (31, 32). Os benefícios que o exercício pode exercer sobre o tecido hepático incluem o aumento da biogénese mitocondrial devido à grande mobilidade de nutrientes e a aceleração geral da função metabólica (31). Segundo (31) os resultados obtidos após 60 minutos de exercício agudo parecem constituir um estímulo eficiente com efeitos pronunciados na regulação da expressão genética do fígado (32). Até à data, não existem estudos, que associem os efeitos de uma sessão de exercício agudo na hepatotoxicidade induzida pela DOX. Já para o tecido cardíaco, exercícios de baixa intensidade durante o tratamento crónico de DOX funcionam como protetor contra a toxicidade cardíaca e a sua disfunção, provavelmente através do aprimoramento das defesas antioxidantes e da inibição da apoptose dos cardiomiócitos (20, 106). Estudos também demonstram que o treino de resistência parece melhorar a tolerância miocárdica à DOX (19, 24). Na verdade, os benefícios do EF na terapia cardíaca após tratamentos com DOX estão bem documentados, exemplo disso, é que o exercício aeróbio parece também atenuar a disfunção ventricular esquerda (110). Sob o efeito do exercício regular na toxicidade da DOX desconhecem-se até ao momento os seus benefícios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização da amostra e desenho experimental

O protocolo experimental foi realizado com 40 ratos Wistar machos (Charles River Laboratories Espanã, SA), com aproximadamente 8 semanas de idade, e com um peso médio de 250 gramas, sendo que o peso corporal de cada animal foi sistematicamente controlado durante todo o protocolo (figura 1).

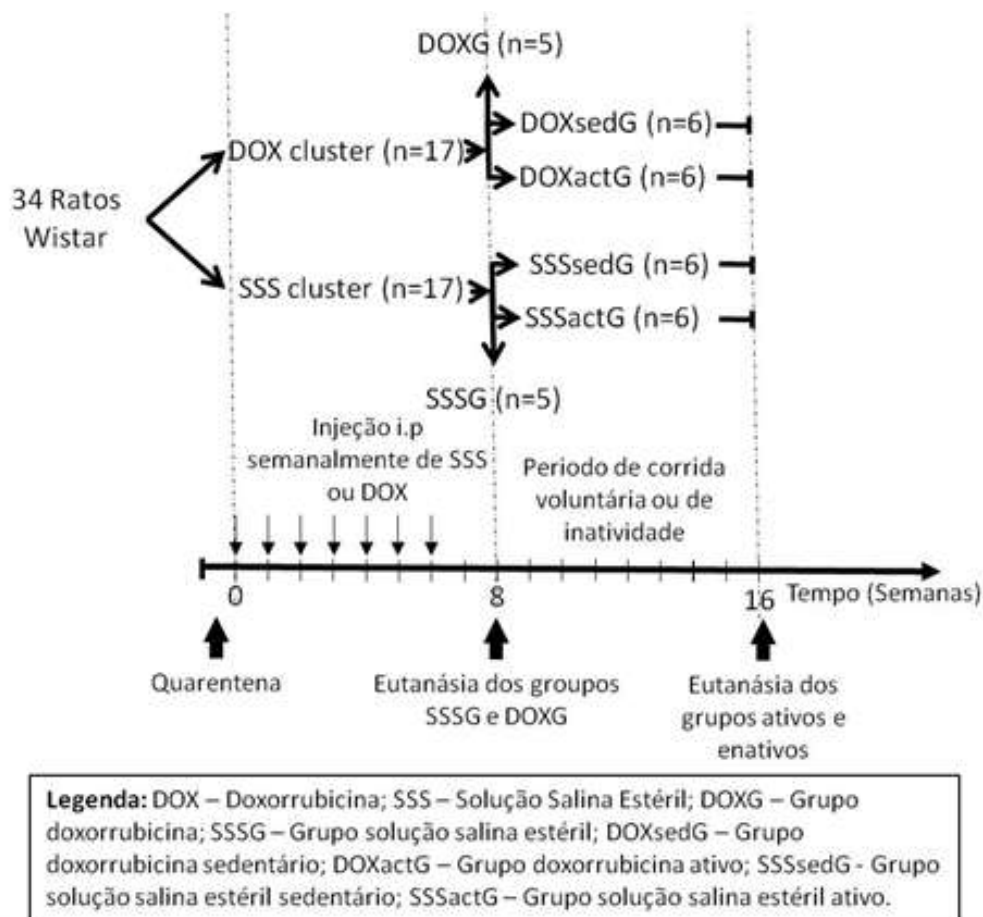


Figura 1 - Desenho experimental.

Durante o procedimento experimental os animais foram alojados em gaiolas coletivas, com 5 ratos por gaiola. Os animais foram mantidos em ambiente controlado, com uma temperatura de aproximadamente 22° C, humidade relativa do ar de aproximadamente 50-60%, com ciclo de luz/escuro invertido 12/12h. Todos os animais tiveram livre acesso à água e ração para roedores. Após uma semana de aclimatização às condições laboratoriais, os animais foram aleatoriamente divididos em dois clusters: 1) animais tratados com doxorubicina (DOX, n=17), receberam semanalmente uma injeção intraperitoneal (ip) deste mesmo fármaco (2mg/kg diluídos em 0,5 ml de solução salina estéril; D1515 Sigma Aldrich Co. LLC) durante sete semanas (dose acumulativa de 14 mg/Kg), e 2) animais tratados com uma solução salina estéril (SSS, n=17), receberam semanalmente uma injeção ip de solução salina estéril (0,5ml) durante 7 semanas. Duas semanas após a última injeção, 5 animais de cada *cluster* foram sacrificados (SSSG, n=5; DOXG, n=5), tendo os restantes sido divididos em 2 subgrupos: 1) sedentários (DOXsedG, n=6; SSSsedG, n=6), alojados em gaiolas sem roda para corrida voluntária, e 2) ativos (DOXexeG, n=6; SSSexeG, n=6), alojados em gaiolas equipadas com roda permitindo a corrida voluntária durante dois meses. Ao final de 8 semanas, os animais foram sacrificados e recolhidas amostras hepáticas para serem analisadas histologicamente.

3.2. Sacrifício dos animais, recolha e processamento dos tecidos

Os animais foram sacrificados com uma injeção ip de Xilazina (20mg/Kg) e de Ketamina (80mg/Kg). Cada animal foi colocado na posição supina tendo-se procedido de imediato à respetiva extração do fígado, tendo sido rapidamente lavado em solução salina, seco e pesado. De todos os lobos hepáticos foram cortados pequenos pedaços de tecido (com aproximadamente 5mm³), os quais foram fixados com paraformaldeído 4% (0,1M PBS, Ph de 7,2-7,4; com 2,5% w/v de sacarose e 0,1% de glutaraldeído) durante 24 horas a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em PBS (0,1M, com o Ph

de 7,2-7,4), tendo sido, subsequentemente, desidratados em soluções de etanol, expostos ao xilol e imersos em parafina de acordo com o protocolo histológico habitual. Após a inclusão das amostras em blocos de parafina, procedeu-se ao corte do respetivo tecido com 5 µm de espessura em micrótomo (Leica Microsystems, modelo M2125). De seguida, todos os cortes foram colados em lâminas revestidas com silano (Sigma, S4651-72EA) numa estufa a 35°C durante 48 horas, por forma a melhorar a adesão do tecido à respetiva lâmina. Após este procedimento, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados com etanol e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou com Sirius Red (SR), tendo em vista os procedimentos relativos a estas técnicas. A HE permitiu caracterizar o tecido hepático e avaliar as alterações estruturais. A coloração com SR permitiu uma análise quantitativa das fibras de colagénio do tecido conjuntivo, através da diferente interferência de cores. Para a coloração com o SR, as lâminas estiveram em contacto com SR (0,5g/500ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico) durante uma hora e trinta minutos e, de seguida, foram lavadas duas vezes em 5% de ácido acético, sendo depois removido o excesso de água através da sua agitação; imediatamente após a coloração, os tecidos foram desidratados em etanol de 80%, 90% e 100%, lavados em xilol e por fim fora colocada uma lamela em cada lâmina, utilizando o DPX.

Todas as lâminas, independentemente da coloração, foram analisadas com um microscópio ótico (Carl Zeiss: Imager. A1. Axio), com uma ampliação de 400x.

3.3. Procedimentos de análise morfológica

A coloração em HE permitiu realizar a semiquantificação do dano tecidual. Os parâmetros requeridos e observados foram os seguintes: degenerescência celular, necrose, inflamação e organização tecidual. A cada um destes parâmetros foi atribuída uma pontuação de zero a 3, obtendo-se assim no final um determinado valor de dano tecidual para cada amostra.

Após observação ao microscópico ótico, a gravidade da degenerescência celular foi marcada de acordo com o número de células que apresentam alterações tais como dilatação, vacuolização e núcleos picnóticos, e classificada de: grau 0 = nenhuma alteração; grau 1 = um número limitado de células isoladas (até 5% do número total de células); grau 2 = grupos de células (5-30% do número total de células); e grau 3 = dano celular difuso (30% do número total de células). A inflamação foi classificada em: grau 0 = sem infiltração celular; grau 1 = infiltração leve de leucócitos (1 a 3 células por campo visual); grau 2 = infiltração moderada (4 a 6 leucócitos por campo visual); e grau 3 = infiltração acentuada de neutrófilos. O nível de necrose foi avaliado como: grau 0 = não necrose; grau 1 = focos necróticos dispersos; grau 2 = áreas necróticas confluentes; grau 3 = áreas maciças de necrose. A gravidade da desorganização tecidual foi avaliada com a percentagem do tecido afetado: grau 0 = estrutura normal; grau 1 = menos de um terço do tecido; grau 2 = mais de um terço e menos de dois terços; grau 3 = mais de dois terços do tecido.

A coloração com SR permitiu quantificar o tecido conjuntivo (coloração vermelha) por campo visual recorrendo-se ao software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc).

Para cada lobo hepático foram analisados três cortes por animal para ambas as colorações, tendo as fotografias sido obtidas (10 a 15 fotos por corte) com uma ampliação de 400x.

3.4. Análise Estatística

Os dados referentes à distribuição normal, (Peso Corporal; Peso do Fígado; Peso Relativo do Fígado e Distância Total) são apresentados sob a forma de média e desvio padrão. Tendo os restantes, devido à sua distribuição anormal, são expressos pela mediana e respetivo intervalo interquartil (percentil 25 – percentil 75). Foram utilizados testes não paramétricos para todas as variáveis analisadas, pois as mesmas não possuíam distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre grupos foi utilizado o teste

de Kruskal-Wallis. A análise dos dados foi efetuada com o software IBM SPSS Statistics 23.0 e o nível de significância foi estabelecido com um valor de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra e corrida voluntária

Durante o procedimento experimental, todos os ratos sobreviveram e cumpriram com o protocolo de experimental descrito. Na tabela 1 encontra-se descrito o peso absoluto corporal e do fígado dos animais de cada grupo, o peso relativo do fígado, assim como, a distância total percorrida pelos grupos exercitados administrados com solução salina estéril e com DOX.

Tabela 1 - Valores (média \pm desvio padrão) do peso corporal e do peso absoluto e relativo do fígado de todos os grupos, assim como da distância total realizada pelos grupos ativos.

	Solução Salina			Doxorrubicina		
	SSS	SSSsedG	SSSexeG	DOXG	DOXsedG	DOXexeG
<i>Peso Corporal (g)</i>	386.4 ^a ± 29.70	434.7 ± 57.46	422.7 ± 29.70	312.8 ^b ± 58.32	393.8 ± 74.62	363.2 ± 46.61
<i>Peso do Fígado (g)</i>	9,47 (2,53)	10,77 (2,50)	10,68 (1,44)	10,16 (1,87)	12,11 (1,33)	10,76 (1,42)
<i>Peso Relativo do Fígado (%)</i>	2,44 ^a (0,59)	2,46 ^b (0,36)	2,52 (0,21)	3,35 (0,94)	3,13 (0,44)	2,98 (0,35)
<i>Distância Total (Km)</i>	-	-	23.9 \pm 6.99	-	-	30.5 \pm 19.84

Notas: SSS- Grupo Solução Salina Estéril; DOXG- Grupo Doxorrubicina; SSSsedG- Grupo Solução Salina Estéril Sedentário; DOXsedG- Grupo Sedentário Doxorrubicina; SSSexeG- Grupo Solução Salina Estéril Exercitado; DOXexeG- Grupo Exercitado Doxorrubicina.

^a $p < 0,05$ vs DOXG;

^b $p < 0,05$ vs DOXsedG

Os animais do grupo SSSG apresentam um maior peso corporal aos do grupo DOXG (Tabela 1). Não foram observadas alterações significativas no peso

absoluto do fígado nos vários grupos analisados. Contudo, os animais DOXG e DOXsedG, possuíam, comparativamente aos SSSG e SSSSedG, respetivamente, um maior peso relativo do fígado (Tabela 1). Referente à distância total percorrida, não houve diferenças significativas entre grupos (Tabela 1).

4.2. Quantificação do dano hepático

Relativamente aos animais do grupo SSSG, as amostras hepáticas analisadas histologicamente mostraram em geral uma estrutura normal, com organização preservada e com ligeira esteatose da zona 2 do ácino (Fig. 2). No grupo SSSsedG, as amostras hepáticas apresentavam uma aparência normal, com organização preservada, com exceção de esteatose ligeira da zona 2 do ácino e ligeira dilatação sinusoidal (Fig. 4). No grupo SSSexeG as amostras hepáticas tinham uma aparência normal, com organização preservada, com ligeira esteatose na zona 2 do ácino e com uma ligeira dilatação sinusoidal (Fig. 6).

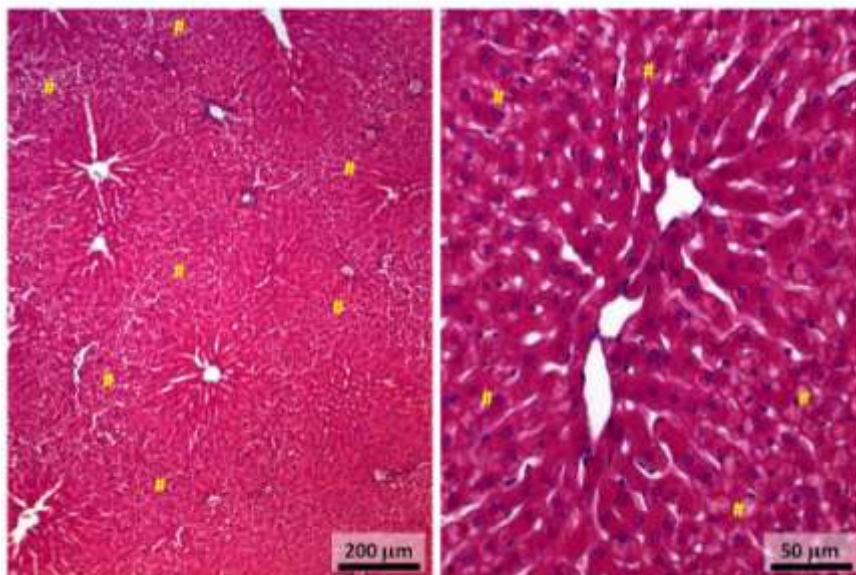


Figura 2 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril (SSSG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal, apesar da ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino. Não há outros sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.

A curto prazo após administração de DOX, verifica-se que os animais do grupo DOXG, apresentavam uma acentuada esteatose generalizada atingindo mais a zona 2 do ácino, uma acentuada dilatação sinusoidal e uma infiltração de células sanguíneas (leucócitos) dispersa (Fig. 3). Foi visível também um alargamento do espaço peri-portal, com aparente edema do mesmo espaço e infiltração de células sanguíneas. Foram ainda observadas pontualmente zonas com células necróticas assim como células com núcleos picnóticos em regiões dispersas dos cortes (Fig. 3).

Na análise quantitativa do dano hepático (Tabela 2), o grupo SSSG, apesar da estrutura histológica global ser normal, apresentava pontualmente hepatócitos isolados com alguns sinais degenerativos, no entanto, o dano neste grupo foi significativamente menor do que o grupo DOXG em todos os parâmetros. O grupo DOXG apresentou menor dano hepático do que o grupo DOXsedG exceto no parâmetro da degenerescência celular. O grupo DOXsedG mostrou maior dano do que o grupo DOXexeG em todos os parâmetros avaliados.

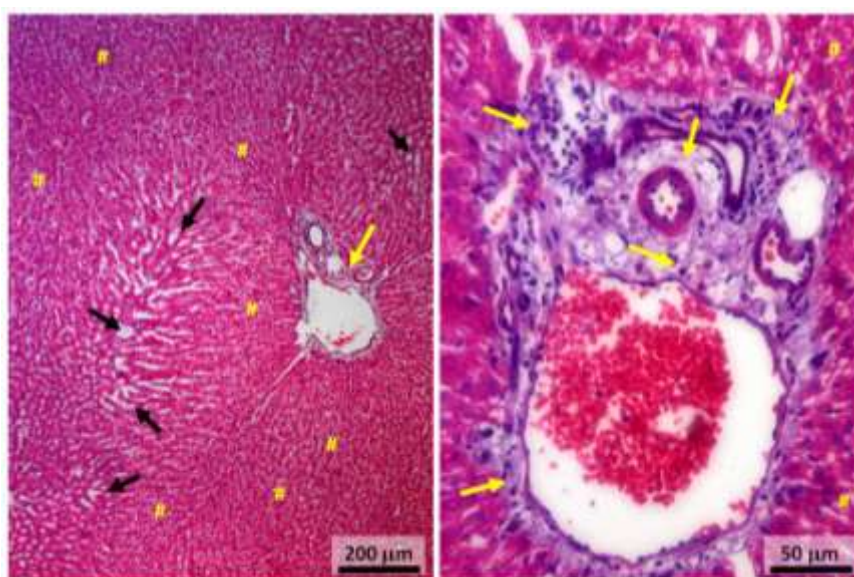


Figura 3 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorrubicina (DOXG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual aparentemente normal mas com uma acentuada esteatose microvesicular generalizada e uma grande dilatação dos sinusoides hepáticos (setas pretas) em alguns ácinos. Nas fotografias é também notório o edema do espaço peri-portal com infiltração desta região por células inflamatórias (setas amarelas).

A longo prazo, na análise qualitativa, as amostras hepáticas dos animais do grupo DOXsedG, apresentavam numerosas alterações celulares dispersas por todo o corte, com sinais de esteatose e degeneração dispersa (Fig. 5). Foi evidente uma acentuada dilatação sinusoidal, congestão vascular e numerosas zonas necróticas confluentes (Fig. 5). Foi ainda visível uma infiltração de células sanguíneas abundante. Continuava a existir dilatação dos espaços peri-portais, com zonas de necrose e infiltração celular.

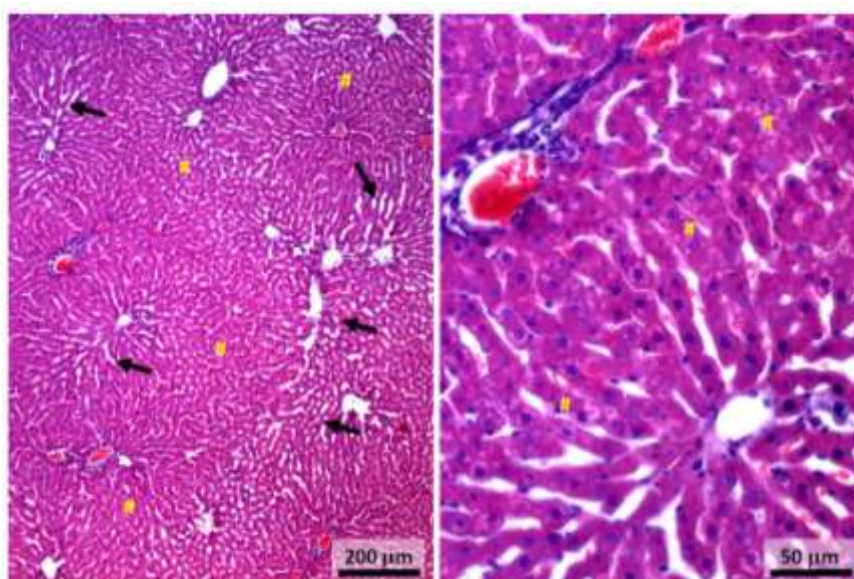


Figura 4 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril sedentário (SSSsedG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal apesar da ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino e de uma aparente dilatação sinusoidal (setas pretas). Não há outros sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.

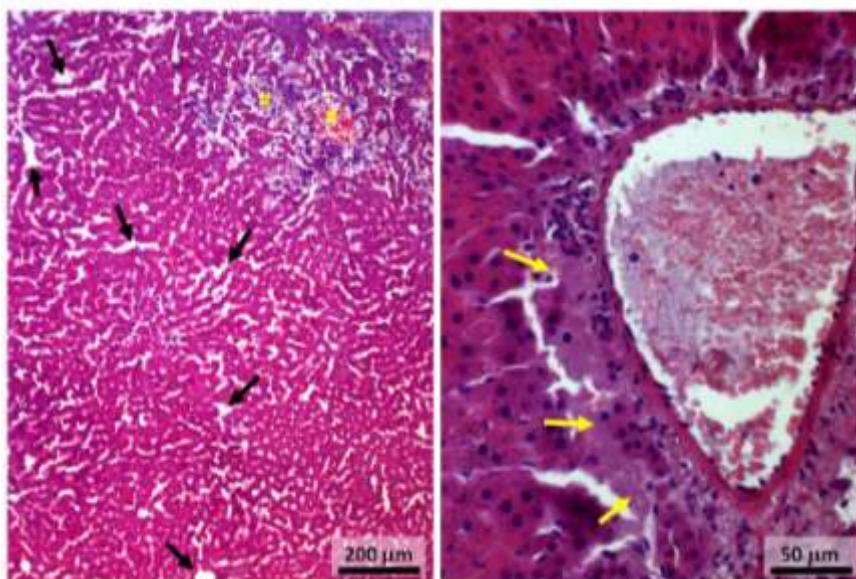


Figura 5 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorubicina sedentário (DOXsedG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Para além da acentuada dilatação sinusoidal dispersa (setas pretas), é observável uma área extensa de necrose celular confluyente de hepatócitos com infiltração hemorrágica, assim como uma zona necrótica peri-portal com infiltração leucocitária (setas amarelas).

Relativamente ao grupo DOXexeG, observou-se uma organização preservada, dilatação dos sinusoides, com congestão vascular e esteatose da zona 2 do ácino, com algumas zonas de infiltração celular nas regiões peri-portais (Fig. 7). O grupo DOXexeG, apresenta uma menor infiltração celular comparativamente ao grupo DOXsedG. O grupo DOXexeG, apresenta uma organização celular preservada, já o grupo DOXsedG, apresenta numerosas alterações celulares dispersas por todo o corte. O grupo DOXexeG, apresenta uma menor dilatação sinusoidal, comparativamente ao grupo DOXsedG.

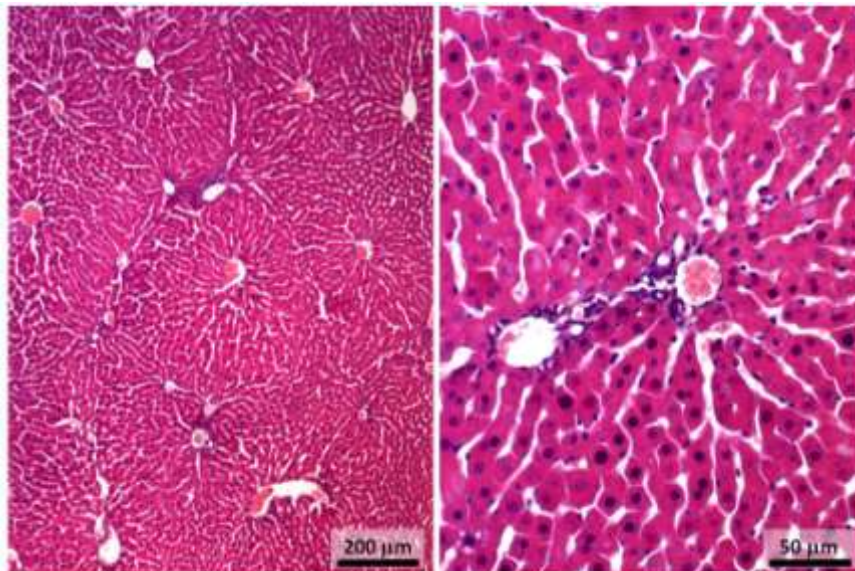


Figura 6 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo solução salina estéril exercitado (SSSexeG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal com uma ligeira dilatação dos sinusoides hepáticos. Não há sinais de degeneração celular, de necrose ou de infiltração de células inflamatórias.

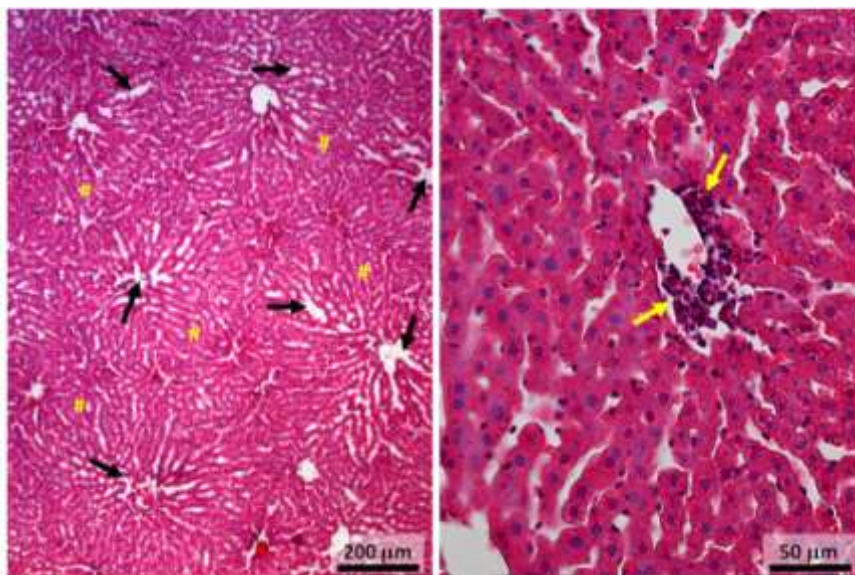


Figura 7 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais do grupo doxorrubicina exercitado (DOXexeG), coradas com hematoxilina-eosina, representativas da estrutura hepática dos animais deste grupo. Pode-se observar uma organização tecidual normal mas com uma ligeira esteatose microvesicular atingindo a região 2 do ácino e dilatação dos sinusoides hepáticos (setas pretas). Na fotografia da direita, é observável uma região peri-portal, sem edema, mas com infiltração leucocitária (setas amarelas).

Tabela 2 - Valores de mediana e amplitude interquartil dos parâmetros utilizados para quantificação do dano tecidual.

	SSS	DOXG	SSSsedG	DOXsedG	SSSexeG	DOXexeG
<i>Degenerescência Celular</i>	1(1) ^a	2(0)	1(1)	2(1) ^c	0(1)	1(1)
<i>Necrose</i>	0(0) ^a	1(0) ^b	0(0)	2(0) ^c	0(1)	0(1)
<i>Inflamação</i>	0(0) ^a	1(1) ^b	0(0)	2(1) ^c	0(0)	1(0)
<i>Organização Tecidual</i>	0(0) ^a	0(1) ^b	0(0)	1(1) ^c	0(1)	0(0)
<i>Total</i>	1(1) ^a	5(1) ^b	1(1)	7(2) ^c	1(1)	3(2)

Notas: SSS- Grupo Veículo; DOXG- Grupo Doxorrubicina; SSSsedG- Grupo Solução Salina Estéril Sedentário; DOXsedG- Grupo Sedentário Doxorrubicina; SSSexeG- Grupo Solução Salina Estéril Exercitado; DOXexeG- Grupo Exercitado Doxorrubicina.

^a p<.05 vs. DOXG

^b p<.05 vs. DOXsedG

^c p<.05 vs. DOXexeG

Na Tabela 2 é de notar que os animais do grupo DOXsedG, comparativamente aos do grupo DOXexeG, apresentavam maiores níveis de necrose e de inflamação, assim como de dano total.

4.3. Conteúdo de colagénio

Nas lâminas coradas com Sirius Red foi notória, na análise qualitativa, uma maior quantidade de fibras de colagénio (coloração vermelha) ao redor dos vasos, principalmente nas regiões peri-portais nos diferentes grupos, havendo uma maior coloração nos animais tratados com doxorrubicina, a qual foi atenuada pelo exercício (Fig. 8). Nos animais tratados com doxorrubicina foi também notória uma maior quantidade de colagénio na periferia dos sinusoides. Os valores de quantificação da percentagem de colagénio nos vários grupos são apresentados na Figura 9.

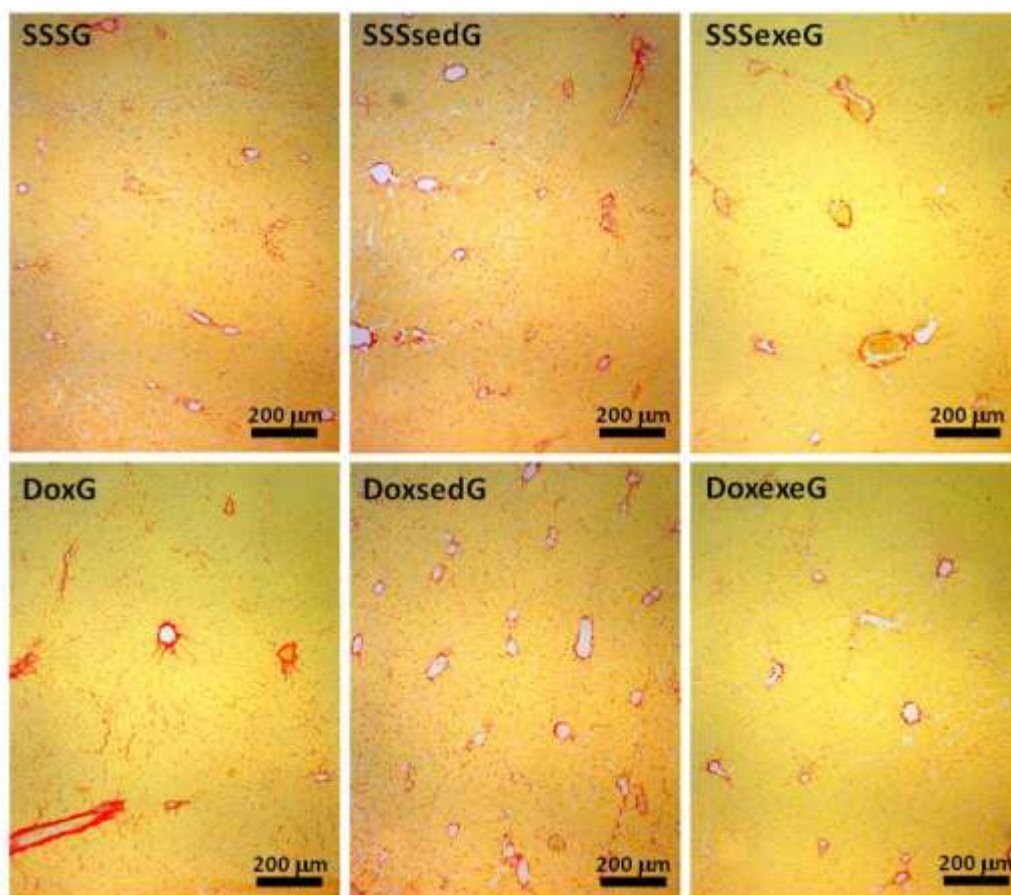


Figura 8 - Fotografias de microscopia ótica do fígado de animais dos grupos solução salina estéril (SSSG), solução salina estéril sedentário (SSSsedG), solução salina estéril exercitado (SSSexeG), doxorubicina (DoxG), doxorubicina sedentário (DoxSedG) e doxorubicina exercitado (DoxExeG), coradas com Sirius red, representativas da estrutura hepática dos animais destes grupos.

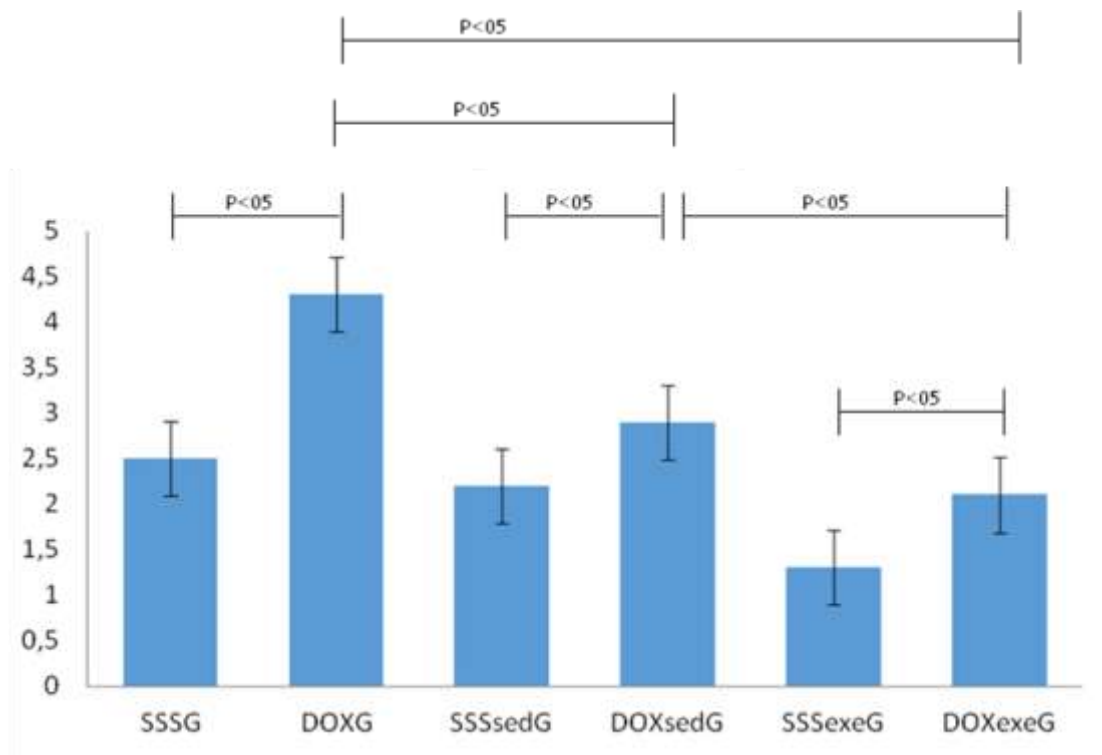


Figura 9 - Valores (média \pm desvio padrão) da percentagem de colagénio na área hepática em, grupo solução salina estéril (SSSG), grupo solução salina estéril sedentário (SSSsedG), grupo solução salina estéril ativo (SSSexeG), grupo doxorrubicina (DOXG), grupo doxorrubicina sedentário (DOXsedG) e grupo doxorrubicina exercitado (DOXexeG).

É de notar, que todos os grupos administrados com DOX possuíam uma maior deposição de colagénio, comparativamente aos respetivos grupos de controlo. É de referir também que, a longo prazo, esta deposição de colagénio tende a diminuir nos animais tratados com DOX.

5. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostram que tanto a curto como a longo prazo, a administração de DOX, mimetizando um tratamento quimioterápico, tem efeitos tóxicos a nível hepático e que a corrida voluntária realizada *a posteriori*, reduz estes efeitos nefastos a longo prazo.

Relativamente ao peso do fígado, os animais do grupo DOXG, comparativamente aos do grupo SSSG, apresentaram um menor peso corporal, facto que pode ser explicado, entre outros, pela anorexia induzida pela DOX com a consequente diminuição da ingestão de alimentos (116, 117, 118). Contudo, por não ser objetivo inicial deste trabalho, a ingestão diária de alimentos, ao longo do protocolo, não foi quantificada. Para além do menor aporte calórico, esta redução de peso poderia também ser atribuída a um maior gasto calórico, apesar desta possibilidade não nos parecer plausível pois não há relatos na literatura que associem um maior metabolismo energético à DOX. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre grupos no peso absoluto do fígado, é de notar que os animais DOXG e DOXsedG, possuíam, comparativamente aos SSSG e SSSSedG, respetivamente, um maior peso relativo do fígado. Estas observações estão em sintonia com os resultados histológicos encontrados nestes grupos e são explicados pela maior acumulação de sangue, devido à congestão vascular, assim como pelo edema tecidual associado à reação inflamatória.

A DOX é considerada um dos agentes neoplásicos mais eficazes no tratamento de várias neoplasias (10, 14, 44). Contudo, o seu uso continuado exerce um efeito tóxico que é dependente da dose, e culmina sobretudo no desenvolvimento de vários efeitos colaterais indesejáveis a curto e a longo prazo (46, 48, 49). É sabido que, para além do coração, também o fígado é um importante alvo dos efeitos indesejados da DOX, participando na farmacocinética do fármaco e, também por isso, sofrendo danos importantes (29, 30; 72, 73, 74). O nosso estudo mostra que a presença de dano tecidual foi mais acentuada a longo prazo, o que corrobora o efeito nefasto cumulativo

associado à DOX descrito na literatura (46, 48, 49, 50, 51). O dano, quer a curto, quer a longo prazo, poderá ser explicado, em grande medida, pela maior e continuada formação de EROs, os quais são apontados, por vários autores, como um dos mecanismos centrais da toxicidade hepática da DOX (111). De facto, sabe-se que o SO, por dano oxidativo enzimático, pode levar ao comprometimento da β -oxidação hepática, originando uma progressiva acumulação de triglicerídeos no citoplasma sob a forma inicial de pequenas vesículas lipídicas (82, 91), resultando em esteatose hepática microvesicular, característica observada no grupo DOXG. Além disso, é descrito que as ERO atuam sobre o ADN mitocondrial causando depleções, e possivelmente, resultando em mutações do ADN que, eventualmente também, contribuem indiretamente para diminuir a funcionalidade da cadeia respiratória mitocondrial (CRm) (90, 92). De facto, o organelo mais afetado pela toxicidade da DOX é sem dúvida a mitocôndria. Este facto deve-se, em parte, à retenção da DOX na membrana interna mitocondrial através da formação de um complexo irreversível com a cardiolipina, afetando o funcionamento da cadeia transportadora de eletrões. Este complexo DOX-cardiolipina, também favorece a formação EROs e a depleção dos níveis de ATP, que contribui ainda mais para a detioração da função mitocondrial (112). Como consequência, a esteatose microvesicular tende a originar uma esteatose macrovesicular que pode culminar numa falência hepática a longo prazo (82, 91). Estas alterações de funcionalidade, ao comprometerem a homeostasia celular, favorecem a ocorrência de morte celular, como observado nos grupos administrados com DOX. A consequente morte de muitas células no órgão, especialmente por necrose, como os nossos resultados evidenciam, motiva a ocorrência de uma reação inflamatória tecidual, detetada em todos os grupos administrados com DOX, com o intuito de remover detritos e propiciar condições favoráveis para que a reparação tecidual ocorra (113). Contudo, a chegada de células sanguíneas ao tecido, não só remove detritos, mas também libertam substâncias tóxicas que promovem a morte de muitas outras células inicialmente viáveis, pelo que, se a resposta inflamatória se prolongar no tempo, pode tornar-se mais prejudicial do que benéfica para o órgão (REFS). A

extensão do dano no tempo é principalmente explicada pela ligação da DOX com a cardiolipina e da sua capacidade de originar ciclos redox continuados (60, 114), não bastando por isso parar de administrar o fármaco para atenuar a sua toxicidade, pois esta tende a agravar-se no tempo, como os nossos resultados mostram na comparação entre DOXG e DOXsedG. Ainda assim, importa referir que a organização tecidual estava mantida nos grupos administrados com DOX, sem existir sinais de fibrose acentuada ou até de maior desorganização, como a cirrose. Mais ainda, a acumulação de tecido conjuntivo, aparentemente, não parece ter consequências graves, uma vez que não há sinais de cirrose. Para além disso, nos animais DOXsedG, isto é, a longo prazo, a sua deposição parece até atenuar-se. No entanto, o que no nosso estudo se considera “longo prazo” corresponde a apenas 8 semanas de vida até ao sacrifício dos animais, desconhecendo-se com o decorrer de um maior período de tempo, se não existirão modificações no conteúdo e na organização do tecido conjuntivo hepático.

Numa tentativa de atenuar os efeitos causados pela DOX, o EF tem sido alvo de atenção, com várias evidências a sugerir que este é capaz de conferir proteção cardíaca contra os efeitos agudos (19, 20, 21) e crónicos da DOX (21). O presente estudo vem demonstrar que estes efeitos benéficos são extensíveis também ao fígado, com o grupo DOXexeG, a apresentar maior integridade estrutural dos hepatócitos, e menores alterações histológicas. Esta melhoria pode estar associada com o aumento das defesas antioxidantes e, consequentemente, com os menores níveis de SO nos hepatócitos, uma vez que o exercício regular melhora as suas defesas antioxidantes, tornando as células mais protegidas, e dessa forma explicando, por exemplo, a menos acentuada esteatose no grupo DOXexeG (31, 115). Para além disso, o EF repetido no tempo, pode exercer sobre o tecido hepático um aumento do *turnover* mitocondrial, com aumento da autofagocitose de mitocôndrias danificadas e promoção da biogénese mitocondrial, motivadas, entre outras, por uma aceleração geral da função metabólica hepática durante cada exercício agudo (31). É possível que o EF possa também ter influenciado favoravelmente a metabolização da DOX, promovendo a sua mais rápida

inativação, embora esta possibilidade constitua uma mera especulação, pois não temos dados sobre isso. De referir ainda que a percentagem de colagénio neste grupo diminui comparativamente a DOXsedG, evidenciando também aqui neste parâmetro o efeito protetor do exercício.

6. CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos, podemos concluir que, tanto a curto como a longo prazo, a DOX tem efeitos tóxicos a nível hepático. O exercício regular tem um papel protetor na toxicidade da DOX a longo prazo, atenuando os níveis de dano tecidual e de deposição de colagénio, apesar de não reverter completamente as alterações induzidas pela DOX.

REFERÊNCIAS

- 1 – Costa, R., Luta Contra o Cancro e Oncologia em Portugal, Edições Afrontamento, 2012.
- 2 - Cf. Sontag, Susan – *Illness as Metaphor*. New York: Farrar, Straus and Giroux, 1978.
- 3 - Direção Geral de Saúde (2015) - Doenças Oncológicas em Números - 2015. Disponível em www.apah.pt/media/publicacoes_tecnicas_sector_saude_2/Doencas_Oncologicas.pdf
- 4 – Simões, M., O Cancro, Fundação Francisco Manuel dos Santos, 2016.
- 5 - Schneider CM, Hsieh CC, Sprod LK, Carter SD, Hayward R. Exercise training manages cardiopulmonary function and fatigue during and following cancer treatment in male cancer survivors. *Integr Cancer Ther* 2007; 6 (3): 235-41.
- 6 - Schneider CM, Hsieh CC, Sprod LK, Carter SD, Hayward R. Effects of supervised exercise training on cardiopulmonary function and fatigue in breast cancer survivors during and after treatment. *Cancer* 2007; 110(4): 918-25.
- 7 - Bonassa EMA. Enfermagem em quimioterapia. São Paulo: Atheneu, 1992:277.
- 8 - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 1995:240.
- 9 - Woodlock TJ, Loughner JE. Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos. In: Rosenthal S, Carignan JR, Smith BD. *Oncologia prática: cuidados com o paciente*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995: 41-64.
- 10 - Wallace, K. B. (2003). "Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy." *Pharmacol Toxicol* 93(3): 105-115.
- 11 - Oliveira, P. J., M. S. Santos et al. (2006). "Doxorubicin-induced Thiol-dependent alteration of cardiac mitochondrial permeability transition and respiration." *Biochemistry (Mosc)* 71(2): 194-199.

- 12 - Pereira, G. et al (2011) Drug-induced Cardiac Mitochondrial Toxicity and Protection: From Doxorubicin to Carvedilol, Current Pharmaceutical Design 17:2113-2129.
- 13 - Raj, S.; Franco, V.I.; Lipshultz, S.E. (2014) Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine 16:315.
- 14 - Bagchi, D., M. Bagchi, et al. (1995). "Adriamycin-Induced Hepatic and Myocardial Lipid-Peroxidation and DNA-Damage, and Enhanced Excretion of Urinary Lipid Metabolites in Rats." Toxicology 95(1-3) 1-9.
- 15 - Takemura, G.; Fujiwara, H. (2007) Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy From the Cardiotoxic Mechanisms to Management, Progress in Cardiovascular Diseases, Vol. 49, No. 5: 330-352.
- 16 - Davies, K.J. and J.H. Doroshov, Redox Cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. J Biol Chem, 1986.261(7): p. 3060-3067.
- 17 - Mukherjee, S., et al., Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression. BMC Pharmacol, 2003. 3: p. 16.
- 18 - Ji, L.L., Exercise-induced Modulation of Antioxidant Defense. Ann N Y Acad Sci, 2002. 959(1): p. 82-89.
- 19 - Ascensão, A., et al., Endurance training attenuates doxorubicin-induced cardiac oxidative damage in mice. Int J Cardiol, 2005.100(3): p. 451-460.
- 20 - Chico, A.J., et al., *Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity*. Journal of Applied Physiology, 2006. 100(2): p. 519-527.
- 21 - Kavazis, A.N., *Exercise preconditioning of the myocardium*. Sports Med, 2009. 39(11): p. 923-935.
- 22 - Knobf MT, Musanti R, Dorward J. Exercise and quality of life outcomes in patients with cancer. Semin Oncol Nurs 2007; 23 (4): 285-96.
- 23 - Schwartz A, Mori M, Gao R, Nail LM, King ME. Exercise reduces daily fatigue in women with breast cancer receiving chemotherapy. Med sci Sports Exerc 2001; 33 (5): 718-23.

- 24 - Ascensão, A., et al., Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(2): p. H722-31.
- 25 - Wonders, K. Y., D. S. Hydock, et al. (2008). "Acute exercise protects against doxorubicin cardiotoxicity." *Integr Cancer Ther* 7(3): p. 147-154.
- 26 - Berthiaume, J. M. and K. B. Wallace (2007). "Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity." *Cell Biol Toxicol* 23(1): 15-25.
- 27 - Valls-Belles, V., C. Torres, et al. (2010). "effect of beer consumption on levels of complex I and complex IV liver and heart mitochondrial enzymes and coenzymes Q9 and Q10 in Adriamycin-treated rats." *Eur J Nutr* 49(3): 181-187.
- 28 - Grattagliano, I., L. Bonfrate, et al. (2009). "Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts." *World J Gastroenterol* 15(39): 4865-4876.
- 29 - Russmann, S., G. A. Kullak-Ublick, et al. (2009). "Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity." *Curr Med Chem* 16(23): 3041-3053.
- 30 - Hardisty, J. F. and A. E. Brix (2005). "Comparative hepatic toxicity: prechronic/chronic liver toxicity in rodents." *Toxicol Pathol* 33(1): 35-40.
- 31 - Quiles, J. L., J. R. Huertas, et al. (2001). "Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat." *J Bioenerg Biomembr* 33(2): 127–134.
- 32 - Hoene, M., R. Lehmann, et al. (2009). "Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise." *J Physiol* 587(Pt 1): 241-252.
- 33 - Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, Sahin O, Nacar A, Karaman O, et al. Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res* 2007;38:380–385.

- 34 - Karaman, A., E. Fadillioglu, et al. (2006). "Protective effects of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver." *Pediatr Surg Int* 22(5): 428-434.
- 35 - Berkow, R.; Beers, M.; Fletcher, a. (2000). *Manual Merk de Saúde para a Família*. Copyright MM, Merk e Co. Editorial Oceano, pp: 819-837.
- 36 - Harrison, R.J. (2004). Cancer and immunology. In: *Current Occupational and Environmental Medicine* (LaDou J, ed). New York:McGraw-Hill, pp: 492-493.
- 37 - Mason (2005). *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine* (em inglês) 4th ed. [S.I.]: Elsevier.
- 38 - Calabresi P, Chabner BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Goodman Gilman A. eds. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991: 799-840.
- 39 - Anelli TFM. Princípios gerais de quimioterapia antineoplásica. In: Coelho FRG, eds. *Curso básico de oncologia do Hospital A.C. Camargo*. Rio de Janeiro: Medsi, 1996: 117-131.
- 40 - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Pro-Onco, 1993:239.
- 41 - Papadopoulou, L. C., G. Theophilidis, et al. (1999). "Structural and functional impairment of mitochondria in Adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression." *Biochem Pharmacol* 57(5): 481-489.
- 42 - Quiles, J. L., J. R. Huertas, et al. (2002). "Antioxidant nutrientes and adriamycin toxicity." *Toxicology* 180(1): 79-95.
- 43 - Carvalho, C., R. X. Santos, et al. (2009). "Doxorubicin: the good, the bad and de ugly effect." *Curr Med Chem* 16(25) 3267-3285.

- 44 - Minotti, G., P. Menna, et al. (2004). "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." Pharmacol Rev 56(2): 185-229.
- 45 - Gokcimen, A., A. Cim, et al. (2007). "Protective effect of N-Acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity." Hum Exp Toxicol 26(6): 519-525.
- 46 - Gewirtz, D.A., A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol, 1999. 57(7): p. 724-41.
- 47 - Kremer, L.C.M., et al., Anthracycline-Induced Clinical Heart Failure in a Cohort of 607 Children: Long-Term Follow-Up Study. Journal of Clinical Oncology, 2001. 19(1): p. 191-196.
- 48 - Von Hoff, D.D., et al., Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. Ann Intern Med, 1979.91(5): p. 710-7.
- 49 - Arola, O.J., et al., Acute Doxorubicin Cardiotoxicity Involves cardiomyocyte Apoptosis. Cancer Res, 2000. 60(7): p. 1789-1792.
- 50 - Scully, R.E. and S.E. Lipshultz, Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. Cardiovasc Toxicol, 2007. 7(2): p. 122-128.
- 51 - Lipshultz, S.E. and M.J. Adams, Cardiotoxicity after childhood cancer: beginning with the end in mind. J Clin Oncol, 2010. 28(8): p. 1276-1281.
- 52 - Oeffinger, K.C., et al., Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. N Engl J Med, 2006. 355(15): p. 1572-1582.
- 53 - R, J., et al., Detection and monitoring of cardiotoxicity-what does modern cardiology offer? Support Care Cancer, 2008. 16(5): p. 437-445.
- 54 - Safra, T., Cardiac safety of liposomal anthracyclines. Oncologist, 2003. 8 Suppl 2: p. 17-24.

- 55 - Van Acker, S. A., K. Kramer, et al. (1996). "Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors." Cancer Chemother Pharmacol 38(1): 95-101.
- 56 - Singal, P. K., N. Iliskovic, et al. (1997). "Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention." FASEB J 11(12): 931-936.
- 57 - Nousiainen, T., E. Vanninen, et al. (2002). "Concomitant impairment of left ventricular systolic and diastolic function during doxorubicin therapy: a prospective radionuclide ventriculographic and echocardiographic study." Leuk Lymphoma 43(9): 1807-1811.
- 58 - Singal, P. K. and N. Iliskovic (1998). "Doxorubicin-induced cardiomyopathy." N Engl J Med 339(13): 900-905.
- 59 - Lefrak, E.A., et al., A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. Cancer, 1973. 32(2): p. 302-314.
- 60 - Singal, P.K., et al., Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. Mol Cell Biochem, 2000. 207(1-2): p. 77-86.
- 61 - Fiuza, M. and A. Magalhães, Trastuzumab and cardiotoxicity. Cardiotoxicity of Oncologic Treatments 2012.
- 62 - Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin, 2009. 59(4): p.225-49.
- 63 - Lebrecht, D., et al., Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. J Pathol, 2005. 207(4): p. 439-44.
- 64 - Tokarska-Schlattner, M., T. Wallimann, et al. (2006). "Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin." C R Biol 329(9): 657-668.

- 65 - Adam-Vizi, V. and C. Chinopoulos, Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(12): p. 639-45.
- 66 - Jackson, M. J., Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005. 360(1464): p. 2285-2291.
- 67 - Yilmaz, S., A. Atessahin, et al. (2006). "Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity." *Toxicology* 218(2-3): 164-171.
- 68 - Sardão, V. A., P. J. Oliveira, et al. (2009). "Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets." *Cell Biol Toxicol* 25(3): 227-243.
- 69 - Barogi, s., A. baracca, et al. (2000). "Effect of the oxidative stress induced by adriamycin on rat hepatocyte bioenergetics during ageing." *Mech Ageing Dev* 113(1): 1-21.
- 70 - Taysi, S., N. Oztasan, et al. (2008). "Endurance training attenuates the oxidative stress due to acute exhaustive exercise in rat liver." *Acta Physiol Hung* 96(4): 337-347.
- 71 - Srivastava, a., J. L. Maggs, et al. (2010). "Role of Reactive Metabolites in Drug-induced Hepatotoxicity." *Handb Pharmacol* 196: 165-194.
- 72 - Kaplowitz, N. (2002). "Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury." *Semin Liver Dis* 22(2): 137-144.
- 73 - Pessayre, D. (2007). " Role of mitochondria in non.alcoholic fatty liver disease." *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S20-27.
- 74 - Chou, j.W. and P.R. Bushel (2009). "Discernment of possible mechanisms of hepatotoxicity via biological processes over-represented by co-expressed genes." *BMC Genomics* 10:272.

- 75 - Ballet F, Vrignaud P, Robert J, Rey C, and Poupon R (1987) Hepatic extraction, metabolism and biliary excretion of doxorubicin in the isolated perfused rat liver. *Cancer Chemother Pharmacol* 19:240–245.
- 76 - Dodion P, Bernstein AL, Fox BM, and Bachur NR (1987) Loss of fluorescence by anthracycline antibiotics: effects of xanthine oxidase and identification of the nonfluorescent metabolites. *Cancer Res* 47:1036–1039.
- 77 - Ji, L.L. and E.W. Mitchell, Effects of Adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. *Biochem Pharmacol*, 1994. 47(5): p. 877-885.
- 78 - Joerger, M., A. D. Huitema, et al. (2005). “ Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma.” *Cancer Chemother Pharmacol* 55(5): 488-496.
- 79 - Injac, R. and B. Strukelj (2008). “Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity.” *Technol Cancer Res Treat* 7(6): 497-516.
- 80 - Injac, R., M. Perse, et al. (2009). “Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer.” *Biomaterials* 30(6): 1184-1196.
- 81 - Roth, R. A. and P. E. Ganey (2009). “Intrinsic vs Idiosyncratic Drug-induced Hepatotoxicity – Two Villains or One?” *J Pharmacol Exp Ther*.
- 82 - Pessayre, D., A. Mansouri, et al. (1999). “Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction.” *Cell Biol Toxicol* 15(6): 367-373.
- 83 - Navarro, A. and Boveris (2007). “The mitochondrial energy transduction system and the aging process.” *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2): C670-686.
- 84 - Bulucu, F., R. Ocal, et al. (2009). “Effects of N-Acetylcysteine, Deferoxamine and Selenium on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity.” *Biol Trace Elem Res*.

- 85 - De Beer, E. L., A. E. Bottone, et al. (2001). "Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review." *Eur J Pharmacol* 415(1): 1-11.
- 86 - Berthiaume, J. M., P. J. Oliveira, et al. (2005). "Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction." *Cardiovasc Toxicol* 5(3): 257-167.
- 87 - Saad, S.Y., T. A. Najjar, et al. (2001) "The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats." *Pharmacol Res* 43(3): 211-218.
- 88 - Valls-Belles, V., C. Torres Mdel, et al. (2008). "Alpha-Tocopherol, MDA-HNE and 8-OHdG levels in liver and heart mitochondria of Adriamycin-treated rats fed with alcohol-free beer." *Toxicology* 249(2-3): 97-101.
- 89 - Krahenbuhl, S. (2001). "Mitochondria: important target for drug toxicity?" *J Hepatol* 34(2): 334-336.
- 90 - Labbe, G., Pessayre, et al. (2008). "Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies." *Fundam Clin Pharmacol* 22(4): 335-353.
- 91 - Mahler, H., A. Pasi, et al. (1997). "Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*." *N Engl J Med* 336(16): 1142-1148.
- 92 - Pessayre, D. and B. Fromenty (2005). "NASH: a mitochondrial disease." *J Hepatol* 42(6): 928-940.
- 93 - Deepa, P. R. and P. Varalakshmi (2003). "Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adrimycin-induced cardiac and hepatic toxicity." *Chem Biol Interact* 146(2): 201-210.
- 94 - Deepa MA, Narmatha BV, Basker S 2004. Antifungal properties of *pseudarthria viscida*. *Fitoterapia* 75: 581-584

- 95 - Blair, S.N., et al., How Much Physical-Activity Is Good for Health, Annual Review of Public health, 1992. 13: p. 99-126.
- 96 - Hoene, M., H. Franken, et al. (2010). "Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise." Diabetologia 53(6): 1131-1141.
- 97 - Lee, I.M. (2004). Physical activity and cancer prevention – data from epidemiologic studies. Medicine Science and Sports Exercise. 35: 1823-1827.
- 98 - Taylor, R. P., M. E. Olsen, et al. (2007). "Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat herat." Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(1): H601-607.
- 99 - Thompson, P. D. (2003). "Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(8): 1319-1321.
- 100 - Penedo, F.J. and J.R. Dahn, Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. Curr Opin Psychiatry, 2005. 18(2): p. 189-193.
- 101 - Slaterry, M.L. ; Curtin, K. ; Benson, J. et al (2004). Physical activity and colorectal cancer. American Journal of Clinical Nutrition. 79: 274-281.
- 102 - Wonders, K.Y., et al., Endurance exercise training preserves cardiac function in rats receiving doxorubicin and the HER-2 inhibitor GW2974. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. 64(6): p. 1105-1113.
- 103 - Kanter, M.M., et al., Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. J Appl Physiol, 1985. 59(4): p. 1298-1303.
- 104 – Ji, L. L. and E. W. Mitchell (1994). "Effects af Adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats." Biochem Pharmacol 47(5): 877-885.

- 105 – Hayward, R., et al., Exercise training mitigates anthracycline-induced chronic cardiotoxicity in a juvenile rat model. *Pediatr Blood Cancer*, 2012. 59(1): p. 149-154.
- 106 - Chicco, A.J., C.M. Schneider, and R. Hayward, Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. 47(2): p. 182-189.
- 107 - Della Torre, P., et al., Cardioprotection by dexrazoxane in rats treated with doxorubicin and paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999. 44(2): p. 138-142.
- 108 - Hydock, D.S., et al., Exercise preconditioning protects against doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Med Sci Sports Exercise* 2008. 40(5): p. 808-817.
- 109 - Ito, H., et al., Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin-induced apoptosis. *Life Sci*, 1999. 64(9): p. 755-761.
- 110 - Scott, J. M., Khakoo, A., Mackey, J. R., Haykowsky, M. J., Douglas, P. S., & Jones, L. W. (2011). Modulation of anthracycline-induced cardiotoxicity by aerobic exercise in breast cancer: current evidence and underlying mechanisms. *Circulation*, 124(5), 642-650.
- 111 - Ji, L.L., Exercise-induced Modulation of Antioxidant Defense. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 959(1): p. 82-92.
- 112 - Schimmel, K.J., et al., Cardiotoxicity of Cytotoxic drugs. *Cancer Treat Ver*, 2004. 30(2): p. 181-191.
- 113 - Segerer S, Kretzler M, Strutz F, et al. Mecanismos de lesão tecidual e reparação em doenças renais. Em: Schrier R, editor. *Doenças do Rim e do Trato Urinário*. Lippincott; Filadélfia: 2007.
- 114 - Doroshow, J.H., Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*, 1983. 43(2): p. 460-472.

115 - Bloomer, R. J. (2008). "Effect of exercise on oxidative stress biomarkers." *Adv Clin Chem* 46: 1-50.

116 - Marks DL, Butler AA, Turner R, Brookhart GB, Cone RD. Differential role of melanocortin receptor subtypes in cachexia. *Endocrinology*. 2003;144: 1513–1523.

117 - Marks DL, Ling N, Cone RD. Role of the Central Melanocortin System in Cachexia. *Cancer Res*. 2001;61: 1432–1438.

118 - Chen C, Tucci FC, Jiang W, Tran JA, Fleck BA, Hoare SR, Wen J, Chen T, Johns M, Markison S, Foster AC, Marinkovic D, Chen CW, Arellano M, Harman J, Saunders J, Bozigian H, Marks D. Pharmacological and pharmacokinetic characterization of 2-piperazine- α -isopropyl benzylamine derivatives as melanocortin-4 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2008;16: 5606–5618.

119 - Ries LAG, editor; Eisner MP, editor; CLK do Kosmer, editor; , Hankey BF, editor; Miller Miller, editor; Clegg L, editor; Edwards BK, editor. , Editores. 2002. *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999* . Bethesda, MD: Instituto Nacional do Câncer.

120 - Simone JV, Lyons J. 1998. A evolução do cuidado do câncer para crianças e adultos . *J Clin Oncol* 16 (9): 2904-2905.